

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659040
 研究課題名（和文） 組織特異的に遺伝子が発現するメカニズムの解明
 研究課題名（英文） Regulation mechanisms involved in tissue-specific gene expression
 研究代表者
 土井 健史 (DOI TAKEFUMI)
 大阪大学・薬学研究科・教授
 研究者番号：00211409

研究成果の概要（和文）：生物を構成する全ての細胞は、全ての遺伝子がコードされた同じゲノム配列を持っている。しかし、いくつかの遺伝子は特定の組織（細胞種）にのみ発現する。この組織特異的な遺伝子発現が生み出されるメカニズムの全容は未だ不明である。本研究では、血管内皮細胞に特異的に発現する Robo4 遺伝子をモデルとして、その発現制御メカニズムの解析を行い、「内皮細胞特異的な遺伝子発現がエピジェネティクス（DNA メチル化）と転写因子の双方により制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Gene expression of the genomic DNA is tightly regulated. Some genes are specifically expressed in particular tissues, although it is not clearly understood how tissue-specific gene expression is regulated. Previous research on skeletal muscle has evidently shown that the skeletal muscle-specific transcription factor MyoD regulates skeletal muscle-specific genes. However, master regulators similar to MyoD have not been identified in most other tissues, suggesting that tissue-specific gene expression is regulated by other mechanisms as well. To investigate these putative mechanisms, we chose the endothelial cell (EC)-specific gene Robo4 and studied the regulation of its gene expression at the transcriptional level, which occurs via transcription factors and epigenetic controls.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：組織特異的遺伝子発現、Robo4 遺伝子、DNA メチル化、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

組織特異的に遺伝子が発現するメカニズムを解明しようと、多くの研究者がさまざまな細胞種を用いて研究を行ってきた。骨格筋においては骨格筋特異的遺伝子の発現調節を、骨格筋特異的に発現する転写因子 MyoD が担うことが示され、「組織特異的に発現する転写因子が組織特異的遺伝子発現を生み出す」というシンプルなモデルで説明された。しかし、我々の研究する血管内皮細胞を含む他の多くの組織においては、MyoD のような

転写因子（マスターレギュレーター）は発見されていない。我々は、内皮細胞特異的遺伝子発現を生み出すマスターレギュレーターの同定を目的とし、内皮細胞特異的に発現する Robo4 遺伝子の発現制御メカニズムについて解析を行った。その結果、Robo4 遺伝子の発現制御因子として、SP1、GABP をはじめとする複数の因子の同定に成功した（CircRes 2007, Blood 2008）。しかし、これらの因子は、内皮細胞以外の細胞にも発現しているいわゆる組織特異的でない転写因子

であったため、これら因子のみで内皮細胞特異性を生み出すメカニズムを説明することはできなかった。そこで我々は転写因子以外の遺伝子発現制御メカニズムであるエピジェネティクスの関与を考え検討を行ったところ、Robo4 プロモーターの転写開始点付近が非内皮細胞で特異的に高メチル化されていること、また、DNA メチル化の有無が、Robo4 遺伝子発現を ON/OFF するスイッチとして機能することで、Robo4 遺伝子の内皮細胞特異的な発現が生み出されることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、エピジェネティクスと転写因子による Robo4 の組織特異的な発現制御のメカニズムをより詳細に解析することを目的とし、以下について検討を行った。

(1) Robo4 プロモーターの DNA メチル化のみで組織特異性が制御されているかを *in vivo* で評価する。

(2) DNA メチル化以外のエピジェネティックな転写制御(クロマチン凝集、ヒストン修飾)が Robo4 遺伝子の内皮細胞特異的な発現に寄与するかを解析する。

(3) 転写因子とエピジェネティクスがどのように協調的に機能することで、Robo4 遺伝子の内皮細胞特異的な発現が生み出されるのかを解析し、制御モデルを構築する。

3. 研究の方法

(1) プロモーターの転写開始点付近のメチル化サイト (CpG 配列) に変異を導入し、メチル化を受けなくしたプロモーターを作製した。得られた変異型プロモーターに LacZ 遺伝子を連結した配列をマウス Hprt 遺伝子上流に 1 コピー挿入したノックインマウス (Robo4mut-LacZ) を作製し、LacZ 遺伝子の発現組織を X-gal 染色により解析することで、変異プロモーターの内皮細胞特異性を評価した。

(2) Robo4 プロモーターのクロマチン凝集状態を解析するために、内皮細胞 (HCAEC) と非内皮細胞 (HCASmC、HEK293) からクロマチンを調製した。得られたクロマチンをマイクロコッカスヌクレアーゼで処理し、切断の程度をリアルタイム PCR により解析した。また、ヒストンのアセチル化が Robo4 遺伝子の発現制御に関与するかを解析するために、上記の細胞を HDAC 阻害剤 (Trichostatin A) で処理後、内在性 Robo4 遺伝子の発現量の変化をリアルタイム RT-PCR により解析した。

(3) 内皮細胞と非発現細胞に、DNA 脱メチル化促進剤 (5-AC) と転写因子 (SP1、GABP) を強制発現するアデノウイルスをそれぞれ、もしくは両方処理したときの、Robo4 遺伝子発現の変化をリアルタイム RT-PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) 転写開始点付近の DNA メチル化を受けない変異プロモーターを持つマウスにおける LacZ 遺伝子の発現組織を解析した。その結果、本マウスにおける LacZ の発現は、野生型プロモーターを持つマウスと同様に、内皮細胞に特異的に発現していることが明らかになった (図 1)。この結果から、非内皮細胞における Robo4 遺伝子発現抑制には DNA メチル化以外の機構も関与することが明らかになった。

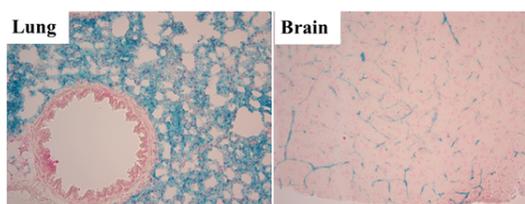


図 1 変異プロモーターマウスにおける LacZ の発現

(2) マイクロコッカスヌクレアーゼを用いた解析から、プロモーター上流領域は内皮細胞、非内皮細胞の両方で高度なクロマチン凝集がみられたが、転写開始点付近の領域は HCAEC と HCASmC は低凝集状態、HEK293 では高凝集状態であった (図 2)。この結果から、クロマチンの凝集が非内皮細胞における Robo4 遺伝子の発現抑制に必須ではないことが示された。また、内皮細胞 (HCAEC)、非内皮細胞 (HCASmC) を Trichostatin A で処理する実験においては、両方の細胞で Robo4 遺伝子発現の抑制が観察された。この結果から、ヒストンアセチル化が組織特異的な Robo4 遺伝子の発現制御に寄与する可能性は低いことが明らかになった。

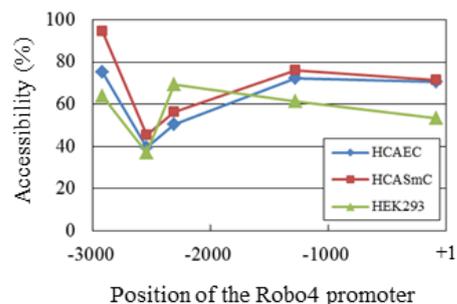


図 2 内皮細胞と非内皮細胞における Robo4 プロモーターの凝集状態

(3) 5-AC 処理、未処理下の内皮細胞と非内皮細胞に、SP1、GABP 発現アデノウイルスを感染させ、各細胞における Robo4 遺伝子発現の測定を行った。その結果、内皮細胞では 5-AC 処理、未処理に関わらず、SP1、GABP 発現は Robo4 遺伝子の発現を上昇させた (図 3)。一方、非内皮細胞では 5-AC 未処理の細胞では SP1、GABP 発現は Robo4 遺伝子発現に影響を与えなかったが、5-AC 処理細胞においては、SP1、GABP 発現は Robo4 遺伝子発現を顕著に上昇させた。この結果から、Robo4 遺伝子の内皮細胞特異的な発現は、プロモーターの転写開始点付近が脱メチル化されていること、SP1、GABP など転写活性化因子が発現していることの両条件を満たした時に誘導されることが明らかになった。

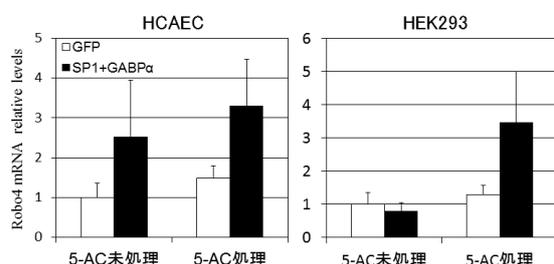


図 3 DNA 脱メチル化、転写因子強制発現が内皮細胞と非内皮細胞の Robo4 遺伝子発現に及ぼす影響

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Yakura Y, Ishihara C, Kurosaki H, Kazuki Y, Komatsu N, Okada Y, Doi T, Takeya H, Oshimura M, An induced pluripotent stem cell-mediated and integration-free factor VIII expression system, *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有, Vol.431, 2013, 336-341
- ② Okada Y, Transcriptional regulation of the endothelial cell-specific receptor, Robo4, *Yakugaku Zasshi*, 査読有, Vol.132, 2012, 1045-1049
- ③ Okada Y, Yonekura M, Watanabe M, Nakai T, Wakimura A, Shimizu M, Kamikawa Y, Kitayama M, Kitajima K, Aird WC, Doi T. Embryonic stem cell differentiation system for evaluating gene functions involved in physiological megakaryocytic differentiation, *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有, Vol.419, 2012, 477-481
- ④ Okada Y, Nobori H, Shimizu M, Watanabe M, Yonekura M, Nakai T, Kamikawa Y, Wakimura A, Funahashi N, Naruse H, Watanabe A, Yamasaki D, Fukada S, Yasui K, Matsumoto K, Sato T, Kitajima K, Nakano T, Aird WC, Doi T. Multiple ETS Family Proteins Regulate PF4 Gene Expression by Binding to the Same ETS Binding Site, *PLoS One*, 査読有, Vol.6, 2011, 1-10 (e24837)
- ⑤ Okada Y, Takano TY, Kobayashi N, Hayashi A, Yonekura M, Nishiyama Y, Abe T, Yoshida T, Yamamoto TA, Seino S, Doi T. New Protein Purification System Using Gold-Magnetic Beads and a Novel Peptide Tag, “the Methionine Tag”, *Bioconjug. Chem.*, 査読有, Vol.22, 2011, 887-893

[学会発表] (計 7 件)

- ① 岡田欣晃、血管内皮細胞特異的な遺伝子発現の制御メカニズム解析、日本薬学会第 133 年会 (招待講演)、2012 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② 酒井美貴、西山侑児、舟橋伸昭、柿内康司、間庭佑典、岡田欣晃、土井健史、Robo4 プロモーターの組織特異的な DNA メチル化パターンが決定されるメカニズムの解析、日本薬学会第 133 年会、2012 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ③ 岡田欣晃、William Aird, 土井健史、Robo4 遺伝子の組織特異的な発現は DNA メチル化により制御される —血管内皮細胞特異的な遺伝子発現が生み出されるメカニズムとは—、第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (招待講演)、2012 年 10 月 20 日、武庫川女子大学薬学部 (兵庫県)
- ④ 西山侑児、酒井美貴、鈴木綾乃、加納義浩、舟橋伸昭、岡田欣晃、土井健史、Robo4 遺伝子の組織特異的な発現を制御する DNA メチル化サイトについての解析、第 13 回 Pharmacology-Hematology シンポジウム、2012 年 6 月 16 日、日本薬学会会長井記念ホール (東京都)
- ⑤ 岡田欣晃、西山侑児、鈴木綾乃、酒井美貴、舟橋伸昭、加納義浩、William Aird、土井健史、DNA メチル化サイトへの点変異導入は Robo4 プロモーターの組織特異性を失わせる、2012 年 5 月 14 日、学術総合センター (東京都)
- ⑥ 岡田欣晃、西山侑児、鈴木綾乃、酒井美貴、舟橋伸昭、加納義浩、成瀬啓樹、William Aird、土井健史、DNA メチル化による Robo4 遺伝子の組織特異的な発現の制御 —Robo4 遺伝子はなぜ血管内皮細胞特異的に発現するのか—、第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2011 年

10月22日、神戸学院大学 ポートアイランドキャンパス（兵庫県）

- ⑦ 岡田欣晃、舟橋伸昭、加納義浩、西山侑児、成瀬啓樹、鈴木綾乃、William Aird、土井健史、DNA メチル化は Robo4 遺伝子を血管内皮細胞特異的に発現させる、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、2011年5月19日、KKRホテル熊本(熊本県)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b018/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 健史 (DOI TAKEFUMI)
大阪大学・薬学研究科・教授
研究者番号：00211409

(2) 研究分担者

岡田 欣晃 (OKADA YOSHIAKI)
大阪大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：50444500